Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 1, Apr. May. 2017, p. 105- 116

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۳، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۳۹۶ ص.۱۱۶-۱۰۵

تشخیص همزمان باکتری‌های بیماری‌زای *لیستریا منوسایتوژنز*، *اشرشیا کلی O157:H7* و جنس *سالمونلا*به روش multiplex PCR در سبزیجات آماده مصرف

صفیه رجب زاده شاندیز[۱]، معصومه بحرینی[۲*]، میرزا محمدرضا شریف مقدم[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۳/۳۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۲۴

چکیده

آلودگیهای باکتریایی مواد غذایی یکی از مهمترین مسائل در زمینه ایمنی مواد غذایی میباشد.لذا استفاده از روشهای تشخیصی سریع و دقیق حائز اهمیت است. یکی از مهم ترین این روشها، تکنیک مولکولی PCR است که امکان تشخیص دقیق و با حساسیت بالا در مدت زمان کم، از مزایای آن است. اما در صورتیکه تشخیص چندین باکتری بیماریزا مد نظر باشد،multiplex PCR (mPCR)بهترین گزینه خواهد بود. در این تحقیق از سه باکتری*لیستریا منوسایتوژنز، اشرشیا کلی O157:H7*و جنس *سالمونلا* (*سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم*) که از باکتریهای بیماریزای مهم منتقل شده از طریق آب و مواد غذایی هستند استفاده شد و به کاهو، که نمونه ای از سبزیجات پر مصرف در تهیه سالاد های آماده است، تلقیح و با روش mPCR بطور همزمان شناسایی شدند. بدین منظور مخلوطی از پرایمر های اختصاصی مربوط به باکتریها یعنی، *inv*A(پروتئین تهاجمیA)برای جنس *سالمونلا* با ۲۸۴ جفت باز، *prf*A(پروتئین افزایش دهنده نسخه برداری از ژنهای عامل ویرولانس) برای *لیستریا منوسایتوژنز*با ۲۱۷ جفت باز و *rfb* (ژن مسئول تولید آنتی ژن*O157*) برای*اشرشیا کلی O157:H7*با ۴۲۰ جفت باز،به همراه DNAاستخراج شده از مخلوط سه باکتری تلقیح شده به کاهو و سایر معرف های واکنشPCR به یک لوله واکنش، منتقل و همزمانPCRشدند. با این روش، امکان تشخیص همزمان سه باکتری بیماریزای فوق با حساسیت ۱cfu/gامکان پذیر شد.

واژه های کلیدی: باکتریهای بیماریزای غذازاد; سبزیجات آماده مصرف; Multiplex PCR; PCR

مقدمه

آلودگی‌های باکتریایی موادغذایی، یکی از مهم‌ترین مسایل در حوزه سلامت عمومی است. علیرغم افزایش ایمنی در حوزه موادغذایی، مسمومیت ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده، پیوسته افزایش می‌یابد (Beuchat,1996, Kim *et al*., 2006). در بیشتر کشورها که دارای سیستم گزارش‌دهنده و مستندسازی این دسته از بیماری‌ها هستند، در طی چند دهه اخیر افزایش قابل توجهی از بیماری‌های مذکور دیده شده است. بطوری‌که در ایالات متحده آمریکا، پس از بیماری‌های تنفسی و ریوی، مسمومیت ناشی از مصرف مواد غذایی در درجه دوم اهمیت قرار دارد (WHO, 2007). در مطالعات صورت گرفته در ایالات متحده آمریکا، مشخص شده است که ۳/۳ تا ۱۲ میلیون مورد بیماری‌ها، ناشی از غذا بوده که در اثر ۷ باکتری بیماری‌زای مهم حادث شده و هزینه سالیانه بین ۵/۶ تا ۳۵ میلیون دلار در برداشته است. به‌عنوان مثال در سال ۲۰۱۰ میلادی، ۹۹۰۲۰ مورد[۳] سالمونلوزیس انسانی در اروپا گزارش شده است (kagkli *et al*., 2011).در سال ۲۰۱۲، ۴۰۰۰ عفونت گزارش شده ناشی از *اشرشیا کلی*[۴]، مربوط به سروتایپ O157:H7 بوده است (EFSA, 2012) و در همین سال، عفونت شایعی نیز توسط *لیستری*[۵] *منوسایتوژنز*گزارش شده است که سبب ۱۴۶ مورد بیماری و ۲۹ مورد مرگ شده است (CDC 2011, 2012a, b)[۶].

سالمونلا یکی از مهم ترین باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی در سطح جهان است که باعث بیماری سالمونلوزیس در انسان و

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی.
۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد
(* - نویسنده مسئول: Email: mbahreini@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v1395i0.47729

3 Salmonellosis
4 *E.coli O157:H7*
5 *Listeria monocytogenes*
6 Centers for Disease Control

حیوان می شود مهم ترین سرووارهای این جنس، *سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم*[1]*و سالمونلا انتریکا سرووار انتریتیدیس*[2] است (Herikstad *et al*., 2002). گونه‌های *سالمونلا* عموما سبب عفونت‌های روده‌ای می‌شوند که با تب، دردهای شکمی و اسهال همراه است. تب تیفوئید، بدون عارضه اسهال، تنها از طریق تماس مستقیم انسانی یا مصرف غذاهای آلوده با منشا دامی ایجاد می‌شود.

*لیستریا منوسایتوژنز*نیز به‌عنوان یک بیماری‌زای انسانی و حیوانی شناخته شده است که عامل چندین عفونت است و تحت عنوان لیستریوز شناخته می‌شود. بطورکلی این باکتری قادر است به سیستم اعصاب مرکزی حمله کند و سبب مننگو انسفالیت[3] و آبسه مغزی شود (Join-Lambert *et al*., 2005). مصرف مواد غذایی آلوده مانند سبزیجات، شیر و محصولات گوشتی و توجه به این نکته که این باکتری حتی در دماهای پایین زنده است و توان تکثیر دارد، می‌تواند منبع مهمی در بروز عفونت‌های تک‌گیر و یا همه‌گیر باشد.

اشرشیا کلی *O157:H7* یکی دیگر از باکتری‌های بیماری‌زای مهم انسانی است که سبب بروز کولیتهموراژیک[4]، [5]سندرم اورمی همولیتیک و[6]ترومبوسیتوپاتیکپورپورا می‌شود (Armstrong *et al*., 1996). ایجادمسمومیتتوسطاینباکتری،با مصرف غذای آلوده، از همه جای دنیا گزارش شده‌است. شدت این بیماری و میزان کم باکتری برای ایجاد عفونت (کمتر از ده عدد باکتری) سبب شده است که این باکتری به‌عنوان یکی از عوامل بیماری‌زای مهم غذایی مطرح باشد. دام‌ها بزرگترین مخزن این باکتری هستند و گوشت و شیر دام‌های آلوده مهمترین منبع آلودگی انسانی هستند (Karmali, 1989).

تشخیص و شناسایی باکتری‌های بیماری‌زا به‌منظور حفظ سلامت و ایمنی غذا از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. روش‌های مبتنی بر کشت و شمارش میکروارگانیسم‌ها، یکی از متداول‌ترین روش‌ها بوده و تحت عنوان روش‌های کلاسیک مرسوم است. اساس این روش‌ها، کشت باکتری در محیط کشت‌های مختلف و دست‌یابی به کلنی‌های قابل رویت، در یک محیط جامد انتخابی و در ادامه انجام آزمایشات بیوشیمیایی جهت تشخیص نهایی باکتری است (Jasson et al., 2010). بطوری‌که جهت رسیدن به جواب منفی ۲ تا ۳ روز و جهت بدست آوردن جواب مثبت تایید شده، ۷ تا ۱۰ روز کاری، زمان لازم است. علاوه بر این، حجم زیادی محیط کشت و معرف استفاده می‌شود، که مقرون به‌صرفه نمی‌باشد (Jaykus, 2003).

طی سال‌های اخیر روش‌های مبتنی بر اسید نوکلئیک در زمینه میکروبیولوژی مواد غذایی گسترش زیادی یافته است چرا که نسبت به روش‌های مبتنی بر کشت مزایای بیشتری از جمله دست‌یابی به نتیجه در زمان کوتاه‌تر، حساسیت و اختصاصیت بالادارد (Jasson *et al*. 2010; AOAC International2012). امروزه PCR[7] به‌عنوان یک روش مناسب و موفق، جهت تشخیص باکتری‌های بیماری‌زا مطرح است (Fagerlund *et al*., 2004; Bertrand and Roige, 2007; Rawool *et al*., 2007; Rahn *et al*.,1992) و در همین راستا، اخیرا استانداردهای بین‌المللی در جهت استفاده از تکنیک PCR برای تشخیص باکتری‌های بیماری‌زای غذا زاد تدوین شده است. (ISO/TS 20836:2005، ISO/TS 20837:2006، ISO 20838:2006).

لازم به ذکر است که همین روش، در صورتی‌که برای نمونه‌های متعدد بصورت جداگانه بکار برده شود، بسیار وقت‌گیر خواهد بود. لذا از تکنیک multiplex PCR(mPCR) استفاده می‌شود (Liu *et al*. 2013, Ryu *et al*., 2011, Wang *et al*., 2012). mPCR قادر است مخلوطی از ژنوم باکتریایی مختلف را در همان مدت زمانی‌که برای PCR، صرف می‌شود، تکثیر نماید. که این امر از نظر مصرف مواد و صرف زمان مقرون به‌صرفه است. از این روش، جهت تشخیص و شناسایی انواع باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی استفاده شده است و محققین زیادی توانسته‌اند با کمک این تکنیک چندین نمونه باکتری بیماری‌زای مختلف را هم زمان در ماده غذایی شناسایی کنند. به‌عنوان مثال Lee وهمکارانش (۲۰۱۴) توانستند با این تکنیک بطور همزمان باکتری‌های *اشرشیا کلی O157:H7*، *باسیلوس سرئوس*[8]، *ویبریو پارا همولیتیکوس*[9]، گونه های *سالمونلا*، *لیستریا منوسایتوژنزو استافیلوکوکوس اورئوس*[10] را در کاهوی آلوده شده، تشخیص دهند. Guan و همکارانش (۲۰۱۳)، تکنیکmPCR را جهت تشخیص همزمان ۵ باکتری بیماری‌زای مواد غذایی شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا منوسایتوژنز*، *اشرشیاکلی O157:H7*،گونه‌های جنس *سالمونلا* و *یرسنیا انتروکولیتیکا*[11] در گوشت خوک که بطور مصنوعی آلوده شده بود، بکار بردند. در سال Kim و همکارانش (۲۰۰۵)، متد ترکیبی mPCR و RAPD[12] را جهت تشخیص مولکولی سرووارهای مختلف *اشرشیا کلی O157:H7*، در نمونه‌های مدفوع و

1 *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*
2 *Salmonella enterica* serovar *enteritidis*

3Meningoencephalitis
4Hemorrhagic colitis
5Hemolytic-uremic syndrome
6Thrombocyto patrick purpura
7 Polymerase chain reaction

8 *Bacillus cereus*
9 *Vibrio parahaemolyticus*.
10 *Staphylococcus aureus*
11 *Yersinia enterocolitica*
10 Random Amplified Polymorphic DNA

گوشت خوک، گاو و جوجه بکار بردند.

در تحقیق حاضر با توجه به اهمیت موضوع و بهینه‌سازی روش، کاهو به‌عنوان یک سبزی آماده مصرف انتخاب و با مخلوطی از سه باکتری *سالمونلا تیفی موریوم، لیستریا منوسایتوژنز* و *اشرشیا کلی O157:H7* در غلظت‌های مختلف بطور مصنوعی، آلوده گردید و سپس جهت تشخیص سریع و همزمان آن‌ها از تکنیک mPCR استفاده شد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی و شرایط کشت

گونه‌های باکتریایی استفاده شده در این تحقیق عبارت بودند از: *سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم* PTCC1709[1] و *لیستریا منوسایتوژنز* PTCC 1298 خریداری شده از مرکز کلکسیون میکروبی ایران و *اشرشیا کلی O157:H7* NCTC 12900[2]، خریداری شده از مرکز کلکسیون بین‌المللی.از سه سویه باکتریایی ذکر شده در محیط تریپتیکاز سوی براث[3] (TSB, CM 129 B, Oxoid, UK) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت شبانه تهیه شد. بعد از گذشت ۱۸-۲۴ ساعت و مشاهده رشد کافی، با خواندن جذب آنها در طول موج ۶۰۰ نانومتر و مقایسه با غلظت ۰/۵ مک فارلند و همچنین شمارش کلنی، تعداد باکتری‌ها محاسبه گردید. سپس توسط سرم فیزیولوژی استریل رقت‌های سریال 10^{6}cfu/ml تا 10^{0} تهیه گردید (Bhagwat *et al*.2004, Germini *et al*,.2009)

استخراج DNA

در این تحقیق سه روش استخراج DNA مورد استفاده و بررسی قرار گرفت. ابتدا کشت شبانه حاصل از هر کدام از سویه‌های باکتریایی در دور ۱۰۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. فاز مایع دور ریخته و توده سلولی دو بار با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد و در نهایت در ۲۰۰μl سرم فیزیولوژی حل شد.

در روش جوشاندن ابتدا سوسپانسیون میکربی ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش و سپس ۱۰ دقیقه در دمای $^{\circ}$c ‎-۲۰ نگه داشته شد و به مدت ۳ دقیقه در دور ۱۴۰۰۰ g سانتریفوژ شد، فاز مایع که حاوی DNA بود به ویال استریل منتقل و در فریزر $^{\circ}$c ‎-۲۰ نگهداری شد (Kawasaki *et al*., 2005).

روش دیگر استفاده از کیت استخراج DNA بیونیر (شرکت بیونیر، کره) بود که مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. استفاده از پروتئیناز K و ایزو پروپانل، به همراه ۱۰ دقیقه گرمادهی در حمام آب ۶۰ درجه سانتی‌گراد و استخراج DNA با کمک ستونهای فیلتردار و بافر مخصوص، از ویژگی‌های این کیت است.

در روش سوم، از کیت استخراج DNA مخصوص باکتری‌های گرم مثبت شرکت دنا زیست[4](شرکت دنازیست، ایران) استفاده گردید و مطابق دستورالعمل کیت استخراج انجام شد. در این روش با استفاده از گلوله‌های کوچک شیشه‌ای، ابتدا دیواره سلولی باکتری‌ها تخریب و در ادامه با استفاده از آنزیم‌های پروتئینازK[5]، RNAase، لیزوزیم[6] و مراحل متوالی گرم خانه‌گذاری در حمام آب گرم و سرمادهی در یخ، فرایند استخراج تکمیل می‌شود. بعد از استخراج DNA توسط هر یک از روش‌ها، جهت تائید حضور و خلوص DNA و درستی روش استخراج از دستگاه نانودراپ[7]– UV–vis analysis TMSPC-8 (USA) استفاده شد.این دستگاه قادر است غلظت DNA را با قرائت جذب نوری آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر و غلظت پروتئین (که ممکن است بصورت ناخالصی همراه با DNA باشند) را با قرائت جذب نوری‌اش در ۲۸۰ نانومتر بدست آورده و با اندازه‌گیری نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰، خلوصDNA را نشان دهد.

شرایط PCR و PCRmultiplex

اسامی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه و توالی آنها در جدول ۱ لیست شده است.ژن‌های انتخابی عبارت بودند از: ژن *invA* (مسئول تولید پروتئین تهاجمی)[8]در جنس *سالمونلا*، ژن *rfb*[9](آنتی‌ژن O157) در *اشرشیا کلی O157:H7*و ژن *prfA* (فعال‌کننده نسخه برداری از ژن‌های بیماری‌زا)[10]در *لیستریا منوسایتوژنز*. علاوه بر این پرایمر عمومی ژن16S rRNA به‌عنوان کنترل داخلی، جهت تائید حضور DNA باکتریایی مورد استفاده قرار گرفت.

شرایط PCRsingle

همه واکنش‌های PCR در حجم ۲۵ μl و با استفاده از کیت Genet Bio (شرکت جنت بیو، کره) انجام شد. مقادیر استفاده شده عبارت بودند از: بافر (2/5μl۱۰x))، $MgCl_2$ (25mM2/5μl)، آنزیم *Taq* پلیمراز (۵U/μl) 0/2μl،dNTPs0/4μl(10mM)، پرایمرهای رفت و برگشت (10 pmol) 1μl، از هر کدام DNA استخراج شده از هر نمونه ۲μl، آب مقطر دیونیزه 15/4μl. سپس نمونه‌ها در دستگاه ترمو سیکلر (Bio-RadT100,thermal cycler, Germany) با

1Persian Type Culture Collection
2National Collection of Type Cultures
3Trypticase Soy Broth
4DENAzist extraction DNA kit
5 Proteinase K
6Lysozyme
7 NanoDrop
8 Invasion protein A
9Transcriptional activator of the virulence factor
10Antigen O157 prudiucer

شرایط دمایی و برنامه زمانی زیر قرار داده شدند:واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴°C، ۵ دقیقه؛ ۳۵ سیکل واسرشت‌سازی در ۹۴°C، ۳۰ ثانیه؛ اتصال آغازگرها در ۵۵°C، ۳۰ ثانیه؛ سنتز قطعه مورد نظر در ۷۲°C، ۳۰ ثانیه و گسترش نهایی در ۷۲°C، ۷ دقیقه.

جدول ۱- لیست پرایمرهای استفاده شده در واکنش PCR و mPCR

منبع	طول قطعه تکثیر شده	توالی پرایمر	ژن هدف	نام باکتری
Rahn *et al*.,1992	284 bp	F-GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA R-TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C	*invA*	*Salmonella thyfimurium*
Germini *et al.*, 2009	217 bp	F- TCA TCG ACG GCA ACC TCG G R- TGA GCA ACG TAT CCT CCA GAG T	*prfA*	*Listeria monocytogenes*
Maurer *et al*.,1999	420 bp	F:CGTGATGATGTTGAGTTG R:AGATTGGTTGGCATTACTG	*rfb*	*E.coli O157:H7*
Jiang, *et al*.,2006	1460 bp	27F: AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 1492R: CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT	*16s rRNA*	General primer

شرایط PCR Multiplex

در این قسمت نیز حجم نهایی واکنش ۲۵ µl و حجم DNA مخلوط سه باکتری، ۳ µl بود. در واکنش mPCR، جفت پرایمرهای اختصاصی هر کدام از باکتری‌ها، با حجم‌های تعیین شده بهمراه معرف‌های دیگر به یک ویال، منتقل و بعد از افزودن DNA مخلوط سه باکتری، حجم نهایی با آب مقطر دیونیزه به ۲۵ µl رسانده و به دستگاه PCR منتقل شد. مقادیر و حجم های مورد نیاز جهت انجام واکنشmPCR عبارت بودند از: بافر(۱۰x) 2/5µl، MgCl2 (25mM) 2/5µl، آنزیم *Taq* پلیمراز (۵U/µl) 0/5µl، dNTPs1µl(10mM)، پرایمرهای رفت و برگشت (10 pmo) *لیستریا منوسایتوژنز* و *اشرشیا کلی O157:H7*1µl و جنس *سالمونلا* 0/8 µl، آب مقطر دیونیزه 9/9µl. واکنش mPCR به شرح زیر انجام شد: واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴°C، ۳ دقیقه؛ ۳۵ سیکل واسرشت‌سازی در ۹۴°C، ۳۰ ثانیه؛ اتصال آغازگرها در ۵۷°C، ۳۰ ثانیه؛ سنتز قطعه مورد نظر در ۷۲°C، ۹۰ ثانیه و گسترش نهایی در ۷۲°C، ۱۰ دقیقه.

تلقیح به کاهو

کاهو از فروشگاه‌های محلی خریداری و سپس به قطعات ۱ گرمی برش و توزین شد. جهت استریل کردن کاهو، مطابق زیر عمل شد. ابتدا قطعات ۱ گرمی کاهو در محلول هیپوکلریت سدیم ۳٪ به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. سپس چند قطره از محلول تیوسولفیت سدیم ۱ درصد به ظرف آب مقطر استریل حاوی قطعات کاهو اضافه و بعد از ۲ دقیقه قطعات کاهو از این محلول خارج شدند این کار به‌منظور حذف باقیمانده‌های کلر از کاهو بود. در ادامه قطعات کاهو سه بار با آب مقطر استریل شسته شده و جهت خشک شدن آب اضافی به زیر هود لامینار با شرایط استریل منتقل شدند. در نهایت به‌منظور استریل نهایی ۳۰ دقیقه زیر لامپ UV قرار داده شدند (هر طرف کاهو، ۱۵ دقیقه). در انتها قطعات کاهو به ظروف کاملا استریل منتقل و در یخچال نگهداری شدند (Bahreini *et al*.,2014. Bidawid *et al*., 2000.Butot *et al*., 2007.Dubois *et al*., 2006. Mutsumi *et al*.,2014).

برای اطمینان از آلوده نبودن تکه‌های کاهو و صحت شرایط استریل بکار رفته،چند تکه از کاهوها طبق روش‌های استاندارد میکروبیولوژی به مدت ۲۴ ساعت در محیط بافر پپتون واتر[1] انکوبه شدند وسپس بر روی محیط‌های اختصاصی هر یک از باکتری‌ها (XLD آگار برای *سالمونلا*، آکسفورد آگار برای *لیستریا منوسایتوژنز* و سوربیتول مک کانکی آگار برای *اشرشیا کلی O157:H7*) کشت گردیدند (ISO/TS 20836:2005، ISO/TS 20837:2006، ISO).

جهت تلقیح به کاهوی استریل، ابتدا از سه سوش باکتریایی *سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم، لیستریا منوسایتوژنز و اشرشیا کلیO157:H7* در محیط TSB کشت شبانه تهیه و پس از تعیین غلظت و تهیه رقت‌های سریال، از هر کدام از غلظت‌های cfu/ml ۱۰ تا ۱۰۶ ، ۱۰۰µl به ۱ گرم کاهوی استریل تلقیح شد. سپس هر یک از قطعات کاهو در ۲۰ ml بافر پپتون واتر کشت و به مدت ۶ ساعت در ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شدند و بعد از مخلوط کردن، ۱ ml از محلول برداشته و جهت کارهای مولکولی استفاده شد. یک نمونه بدون تلقیح نیز به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد (Thapa *et al*., 2013, Lee *et al*., 2014, Chung *et al*., 2010).

جهت بررسی و بهینه‌کردن شرایط PCR، ابتدا هر یک از سویه‌های باکتریایی بطور جداگانه به سطح کاهو تلقیح و شرایط PCR بهینه‌سازی شد و سپس جهت بررسی و امکان تشخیص مخلوطی از باکتری‌ها به روش mPCR مخلوطی از سه باکتری بیماری‌زای فوق

1Buffer pepton water

به کاهو تلقیح شد و طبق روش ذکر شده در بالا استخراج DNA از نمونه‌ها صورت گرفت.

نتایج و بحث

در سالهای اخیر مصرف سبزیجات تازه و آماده مصرف در بین عامه مردم رشد زیادی یافته است و این امر باعث افزایش شیوع بیماری‌های عفونی غذازاد شده است. استفاده از آب‌های سطحی آلوده عامل اصلی آلودگی سبزیجات با باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد می‌باشد (بحرینی و همکارن، ۱۳۹۰، Toze, 2006). از این‌رو استفاده از سبزیجات تازه و آماده مصرف که اغلب بصورت خام و یا با حداقل فرایند آماده و مصرف می‌شوند، بعنوان یک خطر بزرگ برای سلامت عمومی محسوب می‌شوند و به همین خاطر تشخیص سریع، به موقع و دقیق باکتری‌های بیماری‌زا دارای اهمیت خاصی است و یافتن روش‌های تشخیصی سریع و دقیق نیاز است.

امروزه روش‌های مبتنی بر اسید نوکلئیک (PCR, mPCR) نسبت به روش‌های مبتنی بر کشت به خاطر مزایای زیادی که دارد (صرفه جویی در زمان، کاهش مصرف مواد، حساسیت و اختصاصیت بالا)، در زمینه میکروبیولوژی مواد غذایی گسترش زیادی یافته است (Jasson *et al*. 2010; AOAC International, 2012).

در این تحقیق برای دست‌یابی به یک روش دقیق و حساس که بطور همزمان بتواند چندین عامل بیماری‌زا را تشخیص و زمان و مصرف مواد را کاهش دهد از روش mPCR استفاده گردید. برای این منظور ابتدا سعی شد استخراج DNA که یک مرحله اساسی و مهم در این روش می‌باشد بهینه‌سازی گردد.

ابتدا طبق روش Kawasaki و همکاران از روش جوشاندن برای استخراج DNA استفاده شد. این روش برای هر سه باکتری خالص *سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم، اشرشیا کلی O157:H7* و *لیستریا منوسایتوژنز* قبل از تلقیح به کاهو و در تمامی غلظت‌های آن‌ها از cfu/ml 10^6 تا 10^0 انجام و PCR گذاشته شد و بعد از انجام الکتروفورز، باند مربوط به تکثیر ژن‌های هدف هر کدام از باکتری‌های فوق، روی ژل آگارز بررسی شد. این روش توانایی استخراج DNA برای دو باکتری *سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم* و *اشرشیا کلی O157:H7* را قبل ازتلقیح به کاهو داشت، اما نتوانست بعد از تلقیح به کاهو، DNA آن‌ها را استخراج کند. همچنین این روش کارایی لازم جهت استخراج DNA *لیستریا منوسایتوژنز*، قبل و بعد از تلقیح به کاهو را نداشت. کیت بیونیر روش دومی بود که استفاده شد. این کیت با توجه به استفاده از پروتئیناز K و ایزو پروپانل، به همراه ۱۰ دقیقه گرمادهی در حمام آب ۶۰ درجه سانتی‌گراد و استخراج DNA با کمک ستون‌های فیلتردار وبافر مخصوص، توانایی حذف عوامل ممانعت‌کننده PCR را دارد. این روش قادر به استخراج DNA دو باکتری *سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم* و *اشرشیا کلی O157:H7* قبل و بعد از تلقیح به کاهو بود، ولی توانایی استخراج DNA *لیستریا منوسایتوژنز*، که یک باکتری گرم مثبت با دیواره سلولی محکم است، را نداشت. در نهایت از کیت دنازیست استفاده شد. آنزیم لیزوزیم و مهره‌های کوچک شیشه‌ای موجود در این کیت به‌خوبی توانست دیواره سلولی *لیستریا منوسایتوژنز* را در هم شکسته و سایر ترکیبات ممانعت‌کننده PCR مانند ترکیبات پروتئینی و باقی مانده‌های RNA، توسط آنزیم‌های پروتئیناز K و RNAase را کاملا حذف کند و توانست DNA هر سه باکتری فوق را قبل و بعد از تلقیح به کاهو استخراج کند. بر اساس این نتایج، روش موجود در کیت دنا زیست به‌عنوان بهترین روش استخراج DNA باکتری‌های بیماری‌زای بکار رفته در ادامه تحقیق، استفاده شد.

مرحله بعدی بهینه‌سازی روش mPCR با استفاده از پرایمرهای مناسب بود. برای این کار ابتدا پرایمرها از متون تخصصی و مقالات نوشته شده در این رابطه انتخاب و پس از بررسی با NCBI/BLAST و اطمینان از داشتن حساسیت و اختصاصیت بالا و عدم داشتن واکنش متقاطع با سایر باکتری‌های هم جنس و غیره، مورد استفاده قرار گرفتند. ژن‌های انتخاب شده جهت طراحی پرایمرها عبارت بودند از: ژن *inv*A برای گونه‌های *سالمونلا*، این ژن مسئول تولید پروتئین تهاجمی در تمامی گونه‌های*سالمونلا* بوده و مهم‌ترین عامل ویرولانس این باکتری محسوب می‌شود. *Rfb* برای *اشرشیا کلیO157:H7* این ژن کد کننده لیپوپلی‌ساکارید (LPS O157) بوده و اختصاصی سرووار *اشرشیا کلیO157:H7* است و به‌عنوان یک مارکر خوب و مناسب برای این باکتری بوده و در تمامی مراحل رشد باکتری بیان می‌شود. علاوه بر این mRNA *rfb* فقط در سلول‌های زنده تولید شده و حضور دارد و بعد از مرگ سلول به سرعت تجزیه می‌شود.

ژن *prfA* فعال‌کننده نسخه‌برداری از ژن‌های ویرولانس *لیستریا منوسایتوژنز*است و مارکر خوبی جهت تشخیص این گونه می باشد. علاوه بر این پرایمر عمومی 16S rRNA به‌عنوان کنترل داخلی، جهت تایید حضور DNA باکتریایی مورد استفاده قرار گرفت. سپس جهت ارزیابی اختصاصیت پرایمرها، هر جفت از پرایمرهای طراحی شده برای هر باکتری بطور عملی بررسی و ارزیابی شدند (Park *et al*.2006). بدین صورت که واکنش PCR برای هر کدام از باکتری‌ها بطور جداگانه با پرایمر اختصاصی باکتری دیگر، گذاشته شد و نتایج نشان داد که پرایمر هر باکتری اختصاصی همان باکتری است و با دو باکتری دیگر واکنش نمی‌دهد (نتایج نشان داده نشده است).

حساسیت PCR نیز با رقت‌سازی سریال از سوسپانسیون میکروبی و تهیه غلظت‌های cfu/ml 10^6 تا ۱۰ و در ادامه با گذاشتن PCRsingle از هر کدام از این غلظت‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت (Lee *et al*. 2014).در نهایت از داده‌های بدست آمده توسط PCR،

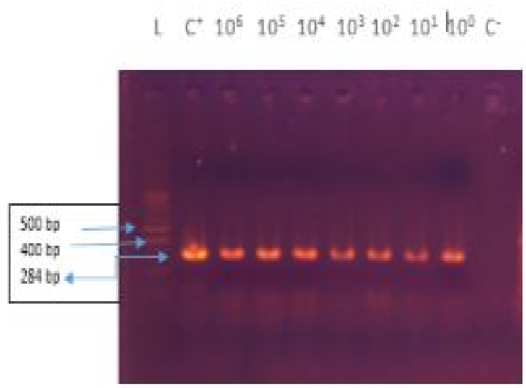
جهت طراحی یک mPCR کارا، استفاده گردید.

جهت بهینه‌سازی PCR از غلظت‌های cfu/ml $10^{6}-10^{5}-10^{4}-10^{3}-10^{2}-10^{1}$ و 10^{0} متعلق به سه سویه باکتریایی، بطور جداگانه قبل از تلقیح به کاهو، PCR گذاشته شد.نتایج حاصله نشان داد که حساسیت این روش تا میزان ۱cfu/ml برای هر کدام از باکتری‌ها می‌باشد (شکل‌های ۱ تا ۳).

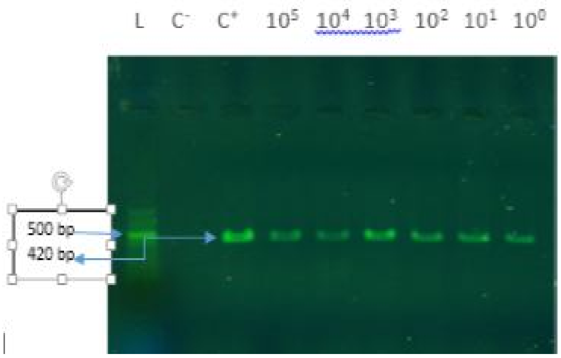
در روش mPCR طراحی و انتخاب پرایمر بسیار مهم و حائز اهمیت است (Guan *et al*.,2013) و رعایت دو نکته اصلی ضروری می‌باشد.

اول اینکه نقطه ذوب (T_m) پرایمرها، شبیه یا نزدیک بهم باشد و دیگر اینکه طول قطعات ژنی تکثیر شونده مربوط به هر یک از ژن‌ها نزدیک بهم بوده و اختلاف زیادی نداشته باشند (Chen *et al*.2012) و در عین حال به اندازه کافی اختلاف وجود داشته باشد که بتوان براحتی قطعات ژنی را از هم تشخیص داد. در صورت عدم رعایت هر کدام از این دو اصل، نتیجه مطلوب حاصل نمی‌شود (Mukhopadhyay,2008).

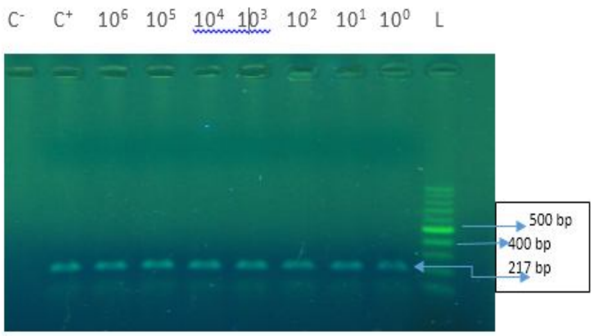
جهت بهینه‌سازی یک برنامه PCR مشترک برای هر سه باکتری همانطور که در بالا ذکر شد ابتدا PCRsingle برای هر یک از آن‌ها گذاشته شد و بعد با استفاده از داده‌های بدست آمده و با اندک تغییرات جزئی، mPCR با مخلوطی از DNAهای استخراج شده سه باکتری مورد آزمایش به همراه وارد کردن جفت پرایمرهای هر باکتری در یک لوله انجام شد. نتایج نشان دادکه سه جفت پرایمر در واکنش mPCR بطور جداگانه عمل کرده و تشخیص با اختصاصیت بالایی انجام شد (نتایج نشان داده نشده است).



شکل ۱- واکنش زنجیرهای پلیمراز *Salmonell spp.* توسط ژن *invA*
C^{-}=negative control, C^{+}= positive controlL=ladder 100bp.
طول قطعه تکثیر شونده: ۲۸٤bp

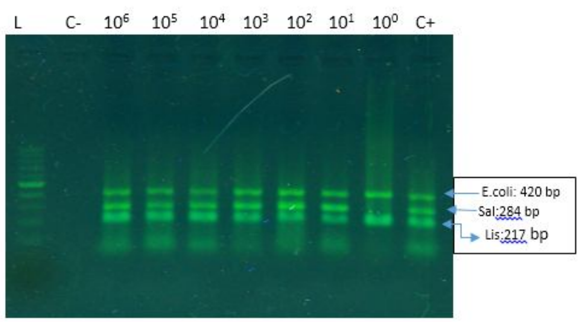


شکل ۲- واکنش زنجیرهای پلیمراز *E.coli o157:H7*توسط ژن *rfb*.
طولC-= negative control, C+= positivecontrolL=ladder100
قطعه تکثیر شونده:۴۲۰bp



شکل ۳- واکنش زنجیرهای پلیمراز*L.monocytogenes*توسط ژن
C-= negative control, C+= positive control .*prfA*
bp217:طول قطعه تکثیر شونده L=ladder 100bp.

سپس mPCR برای سه باکتری خالص با توجه به داده‌های بدست آمده از PCR تک، طراحی و انجام شد (شکل ۴).



شکل ٤- multiplex PCR مربوط به سه سویه باکتریایی
E.colio157:H7(420bp),*L*.monocytogenes(217)
L=ladder 100 .قبل از تلقیح به کاهو, Salmonella spp. *(*284 bp)
bp,C-= negative control, C+= positive control

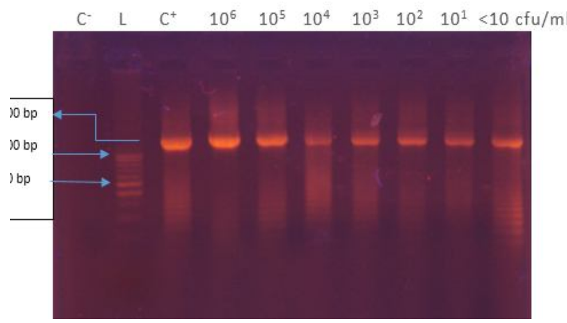
دمای اتصال پرایمرها[1] در واکنش PCRsingle، برای هر کدام از

1Annealing

باکتری‌های بیماری‌زا ۵۵°c و در واکنش mPCR این دما ۵۷°C بود. البته واکنش mPCR در دمای ۵۵°C نیز انجام پذیر بود ولی باندها وضوح کمتری داشتند، لذا جهت بهتر کردن وضوح باندها، دماهای پایین‌تر و بالاتر از ۵۵°C آزمایش شد که در نهایت دمای ۵۷°C با داشتن بالاترین وضوح انتخاب شد.

برای مخلوط سه باکتری نیز با غلظت‌های $۱۰^{۶}$cfu/ml-$۱۰^{۵}$-$۱۰^{۴}$-$۱۰^{۳}$-$۱۰^{۲}$-$۱۰^{۱}$ و $۱۰^{۰}$mPCR گذاشته شد. نتایج نشان داد که این روش قادر است مخلوط سه باکتری را به میزان 1cfu/ml شناسایی کند(شکل ۴)

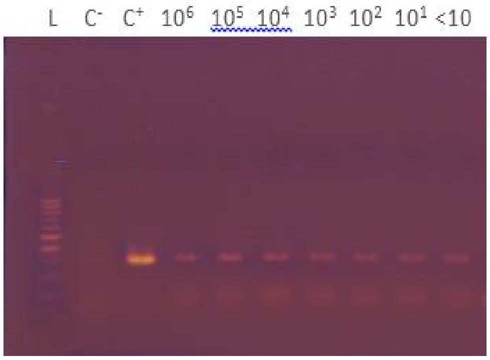
کنترل منفی و مثبت به ترتیب شامل نمونه فاقد DNA و نمونه حاوی DNA سویه استاندارد مورد نظر، برای کلیه تست‌ها به همراه سایر معرف‌های لازم جهت واکنش PCR ،گذاشته شد.



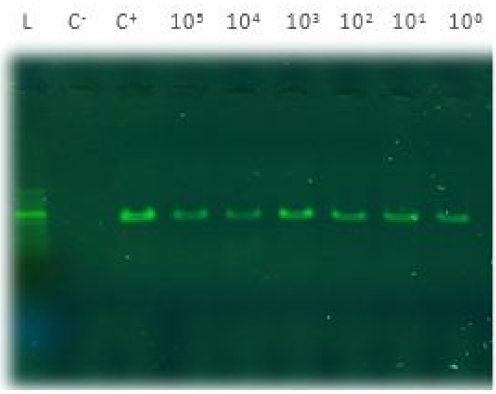
شکل ۳-۵pcr ژن ۱٦ s rRNA سویه *اشرشیا کلی* O157:H7 پس از تلقیح به کاهو با رقت‌های سریال L=ladder 100 bp
C-= negative control, C+= positive control

بعد از بهینه‌سازی روش‌های PCR و mPCR با نمونه‌های خالص باکتریایی، رقت‌های مختلفی از سه باکتری فوق به کاهو تلقیح شد. در اینجا علاوه بر کنترل مثبت (سویه استاندارد)، نمونه‌ای از کاهوی بدون تلقیح، به‌عنوان کنترل منفی نیز در نظر گرفته شد. بعد از استخراج DNA ، جهت اطمینان از حضور باکتری‌ها در نمونه‌های تلقیح شده، از پرایمر عمومی ژن 16s rRNA به‌منظور کنترل داخلی (Germini *et al*,. 2009) استفاده و نمونه‌ها PCR شدند. در اینجا فقط عکس مربوط به سویه *اشرشیا کلی O157:H7* آورده شده و همانطور که در شکل ۵ نشان داده شده است تمام رقت‌های تلقیح شده از باکتری، دارای باند می‌باشند

جهت بررسی میزان حساسیت PCR در ماده غذایی، ابتدا PCRتک برای هر کدام از باکتری‌ها از غلظت $۱۰^{۶}$cfu/g تا $۱۰^{۰}$آنها گذاشته شد. شکل‌های ۳-۶ تا ۳-۸ نمونه‌های الکتروفورز شده متعلق به انجام PCR هر یک ازسویه های باکتریایی بعد از تلقیح به کاهو را نشان می‌دهند. هدف از گذاشتن PCR تک، برای نمونه‌های جدا شده از سطح ماده غذایی، اطمینان از کاربرد و عملکرد مناسب PCR با همان حساسیت و اختصاصیتی است که با آزمایش بر روی نمونه‌های کشت خالص، حاصل شده بود. نتایج نشان دادکه حساسیت PCR به میزان تشخیص ۱ cfu/ml برای هر کدام از باکتری‌ها می‌باشد.

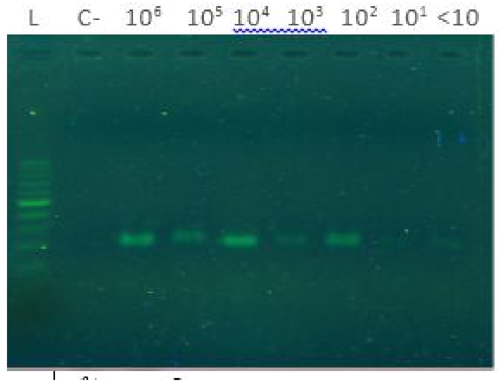


شکل ٦- واکنش زنجیرهای پلیمراز رقت‌های سریال *Salmonella spp.* با ژن *invA*.پس از تلقیح به کاهو.L=ladder 100bp طول قطعه تکثیر شونده:bp284
C-= negative control, C+= positive control

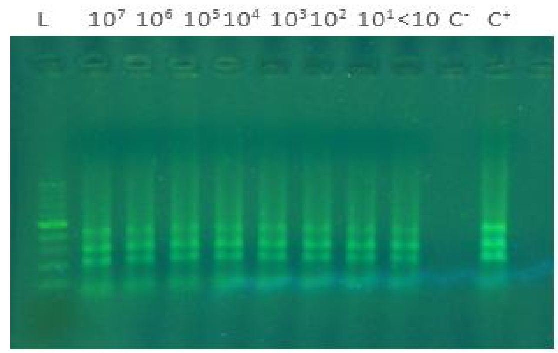


شکل ۷- واکنش زنجیرهای پلیمراز رقت‌های سریال *E.coli o157:H7* با ژن *rfb* . پس از تلقیح به کاهو. C-= negative control, C+= positive control L=ladder 100bp. طول قطعه تکثیرشونده:bp420

شکل ۹ نتایج حاصل از الکتروفورز واکنش mPCR از مخلوط سه باکتری تلقیح شده به سطح کاهو، با غلظت های سریالی $۱۰^{۶}$ cfu/g تا$۱۰^{۰}$ را نشان می‌دهد که در حقیقت هدف اصلی این تحقیق تشخیص همزمان باکتری‌های سه‌گانه فوق در نمونه غذایی، به روش mPCR با تکثیر ژن‌های هدف و اختصاصی هر کدام از باکتری‌های جدا شده از نمونه غذایی می‌باشد. در واکنش mPCR نیز مخلوطی از DNA سه باکتری بیماری‌زا با غلظت‌های $۱۰^{۶}$تا $۱۰^{۰}$ گذاشته شد. نتایج حاصله نشان داد که با این روش می‌توان از نمونه ماده غذایی، مخلوط سه باکتری را تا میزان ۱ cfu/ml تشخیص و شناسایی کرد، که در مقایسه با تحقیقات سایرین نتیجه بسیار مطلوبی است.



شکل ۸- واکنش زنجیرهای پلیمراز *L.monocytogenes* توسط ژن *prfA*. پس از تلقیح به کاهو. C-= negative control, C+= L=ladder 100bp.positive control طول قطعه تکثیرشونده:bp217



m

شکل ۹- multiplex PCR مربوط به سه سویه باکتریایی E.colio157:H7 (420bp), L.monocytogenes(217) *Salmonella spp*. (284 bp) , بعد از تلقیح به کاهو L=ladder 100 bp, C-= negative control, C+= positive control

Germini و همکارانش (۲۰۰۹) متد mPCR را جهت تشـخیص ۳ بـاکتری بیمـاری‌زای *لیســتریا منوســایتوژنز*، *ســالمونلا انتریکا سرووارتیفی موریوم* و *اشرشیا کلی O157:H7* از تخم‌مرغ مایع کامل، بکار بردند. توانایی این روش، تشخیص 10mlcell/25 (۱۰ باکتری در ۲۵ ml تـخم مرغ مـایع) بود. Bhagwat و همکـارانش (۲۰۰۴)، محصـولات تازه (سـبزیجات و سالادهای آماده بسته‌بندی) را با آب آلوده شده، به طریقه مصنوعی، شستشو داده و سپس جهت تشخیص ۳ باکتری بیماری‌زای *لیسـتریا منوسایتوژنز*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *اشرشیا کلی O157:H7* از روش real time PCR استفاده کردند. با بکارگیری روش فوق، *اشـرشیا کلی O157:H7* و جنس *سالمونلا* در مقادیر cfu/ml ۱و ۱۰ به ترتیب و *لیســتریا منوســایتوژنز* تا مقدار cfu/ml ۱۰۰۰ قابل شـناسایی بود نه کمتر.در تحقیق مشابه دیگری کـه توسـط Alarcon وهمکـارانش (۲۰۰۴) انجـام گرفـت تکنیک mPCR جهت تشـخیص سـه باکتری بیماری‌زای مواد غذایی یعنی *لیسـتریا منوسـایتوژنز*، جنس *سـالمونلا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* با حساسیت تشخیص به میزان ۵۷cfu/ml، ۷۹ و ۲۶۰ (به ترتیب) بکار برده شـد. با توجه بکارهای انجام شـده توسط سایرین که بدان اشاره شـد، می‌توان نتیجه گرفت که این روش با داشـتن حساسیت و دقت بالا در حد تشـخیص cfu/ml ۱ می‌تواند جایگزین روش‌های سـنتی شود.

نتیجه‌گیری

روش mPCR به‌عنوان یک روش سـریع با امکان تشخیص هم زمان چندین عامل بیماری‌زا هم در زمینه‌های پزشـکی و هم صـنایع غذایی بسـیار مورد توجه و اسـتفاده قرار گرفته اسـت. در این تحقیق امکان تشـخیص سریع و هم زمان سه باکتری فوق‌العاده بیماری‌زای منتقل شـده از طریق مواد غذایی یعنی *لیسـتریا منوسـایتوژنز*، جنس *سالمونلا* و *اشرشیا کلیO157:H7* با اختصاصیت و حساسیت بالا در حد تشـخیص cfu/ml ۱ به روش mPCR از کاهو بهینه‌سـازی شد. کاهو از سـبزیجات پرمصـرف در تهیه سالادها می‌باشد، و با توجه به اینکـه در بین مواد غذایی، ســالادها به‌عنوان آلوده‌ترین ماده غذایی شــناخته شــده‌اند (فرامرزی و همکاران ۱۳۹۱، بحرینی و همکاران ۱۳۹۰), این روش می‌تواند به امکانی جهت تشــخیص ســریع و زود هنگام باکتری‌های بیماری‌زا و در ادامه، جلوگیری از عواقب خطرناک بعدی، تبدیل شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسـیله از دانشـگاه فردوسـی مشـهد به خاطر تامین کلیه امکانات این تحقیق (گرنت شـماره ۳/۳۱۰۳۶) تشـکر و قدردانی به عمل می‌آید

منابع

بحرینی م، حبیبی نجفی م ب، باســامی م ر، عباس زادگان م، بهرامی ا، اجتهادی ح، ۱۳۹۰، ارزیابی بار میکروبی ســبزیجات تازه طی مراحل فرآوری با روش حداقل فرایند در یک واحد بسته بندی، نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران، (۳)۷، ۲۴۲-۲۳۵.

فرامرزی ط، جنیدی ا، دهقانی س. ۱۳۹۱، بررسی آلودگی باکتریایی مواد غذایی در سطح عرضه مناطق غرب تهران. مجله دانشگاه علوم پزشکی

فسا، سال دوم، شماره ۱.

Alarcon, B., Garcia-Canas, V., Cifuentes, A., Gonzalez, R.and Aznar R., 2004, Simultaneous and sensitive detection of three-foodborne pathogen by multiplex PCR, capillary gel electrophoresis, and laser-induced fluorescence. *Journal of Agriculture and Food Chemistery*, 52, 7180-7186.

AOAC (Association of Official Agricultural Chemists)۲۰۱۲. INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces

Armstrong, G.L., Hollingsworth, J. and Morris, J.G., 1996, Emerging foodborne pathogens: Escherichia coliO157:H7 as a model of entry of a new pathogeninto the food supply of the developed world, *Epidemiology* Review, 18, 29–51.

Bahreini, M., Habibi Najafi, M. B., Bassami, M. R. Yavarmanesh, M., 2014, Optimization of extraction and concentration methods of enteric viruses from the surface of ready to eat vegetables using MS2 coliphage as a model. *Journal of food science and technology*, 11(43), 1-10.

Bertrand, R. and Roig, B., 2007, Evaluation of enrichment-free PCR-baseddetection on the rfbE gene of Escherichia coliO157—application to municipal wastewater, *Water Research*, 41, 1280–1286.

Beuchat, L.R., 1996, Pathogenic microorganisms associated with freshproduce, *Journal of Food Protection*, 59, 204–216.

Bhagwat, A.A., 2004, Rapid detection of Salmonella from vegetable rinse-water using real-time PCR, *Journal of Food Microbiology*, 21, 73–78.

Bidawid, S., Farber, J.M. and Sattar, S.A., 2000, Rapid concentration and detection of hepatitis A virus from lettuce and strawberries, *Journal of Virological Methods*, 88, 175-185.

Butot, S., Putallaz, T. and Sanchez, G., 2007, Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables, *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1): 186-192.

CDC (Center for Disease Control), 2011, Investigation Update: Multistate Outbreak ofE. coliO157:H7 Infections Associated with In-shell Hazelnuts [Online]. Available athttp://www.cdc.gov/ecoli/hazelnuts0157/.

CDC (Center for Disease Control), 2012a. Cholera and OtherVibrioIllness Surveillance System [Online]. Available at http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/cholera_vibrio_surveillance.html.

CDC (Center for Disease Control), 2012b, Multistate Outbreak of HumanSalmonella MontevideoInfections Linked toLive Poultry [Online], Available athttp://www.cdc.gov/salmonella/montevideo-06-12

Chen, J., Tang, J., Liu, J., Cai, Z. and Bai, X., 2012, Development and evaluation of a multiplex PCR for simultaneous detection of five foodborne pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 112, 823–830.

Chung, MS., Kim, CM, Ha, SD., 2010. Detection and enumeration of microorganisms in ready-to-eat foods, ready-to-cook foods and fresh-cut produce in Korea. *Journal of Food Safety*; 30:480–489.

Dubois, E., Hennechart, C., Deboosere, N., Merle, G., Legeay, O., Burger C., et al., 2006, Intra-laboratory validation of a concentration method adapted for the enumeration of infectious F-specific RNA coliphage, entrovirus and hepatitis A virus from inoculated leaves of salad vegetables, *International Journal of Food Microbiology*, 108: 164-171.

EFSA (European Food Safety Authority), 2012. The European Union Summary Report. Trends and Sources of Zoonosesand Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010.European Food SafetyAuthority (442)

Fagerlund, A., Ween, A., Lund, T., Hardy, S.P. and Granum, P.E., 2004, Geneticand functional analysis of the cytK family of genes in Bacillus cereus, Microbiology, 150, 2689–2697.

Germini, A., Masola, A., Carnevali, P. and Marhelli, R., 2009, Simultaneous detection of Escherichia coliO175:H7, Salmonella spp. and Listeria monocytogenes by multiplex PCR, *Food Control*, 20(8), 733-738.

Guan ZP, Jiang Y, Gao F, Zhang L, Zhou GH. AndGuan ZJ, 2013. Rapid and simultaneous analysis of five foodborne pathogenic bacteria using multiplex PCR,*European Food Research and Technology*, 237: 627-637.

Herikstad, H., Motarjemi, Y. and Tauxe, R.V., 2002. Salmonella surveillance: a Global survey of public health serotyping. *Epidemiology Infection*, 129, 1–8.

ISO 11290-2:1998, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes– Part 2: *Enumeration method*.

ISO 16654:2002, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Escherichia coliO157:H7.

ISO 6579:2002, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Salmonella spp.

Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A. and Uyttendaele, M., 2010, Alternative microbial methods: An overview and selection criteria, *Food Microbiology*, 27, 710–730.

Jaykus, L.A., 2003, Challenges to developing real-time methods todetect pathogens in foods, ASM News, 69, 341–347.

Jiang, H., Dong, H., Zhang, G., Yu, B., Chapman, L. R. and Fields, M. W., 2006, Microbial Diversity in Water and Sediment of Lake Chaka, an Athalass ohaline Lake in North western China. *Applied and Environmental Microbiology, 72 (6): 3832–3845.*

Join-Lambert, O.F., Ezine, S., Le Monnier, A., Jaubert, F., Okabe, M., Berche,P. and Kayal, S., 2005, Listeria monocytogenes-infected bone marrow myeloidcells promote bacterial invasion of the central nervous system, Cell.*Microbiology*, 7, 167–180.

Kagkli, D.M., Weber, T.P., Van den Bulcke, M., Folloni, S., Tozzoli, R., Morabito, S., Ermolli, M., Gribaldo, L. and Van den Eede, G., 2011, Application of the modular approach to an in-house validation study of real-time PCR methods

for the detectionand serogroup determination of verocytotoxigenicEscherichia coli, *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 6954–6963.

Karmali, M.A., 1989, Infection by verocytotoxin-producing Escherichia coli. Clinical Microbiology Review, 2, 15–38.

Kawasaki, S., Horikoshi, N., Okada, Y., Takeshita, K., Sameshima, T. and Kawamoto, S., 2005,Multiplex PCR for simultaneous detection ofSalmonellaspp., Listeria monocytogenesandEscherichia coliO157:H7 in meat samples, *Journal of Food Protection*, 68, 551–556.

KimJ., Demeke, T., Clear, R.M.and Patrick, S.K., 2006, Simultaneous detection by PCR of Escherichia coli, Listeria monocytogenes and Salmonella typhimurium in artificially inoculated wheat grain. *International Journal of Food Microbiology*, 111(1), 21-25.

Kim J, Kim SH, Kwon NH, Bae WK, Lim JY, Koo HC, Kim JM, Noh KM, Jung WK, Park KT, Park YH.2005, Isolation and identification of Escherichia coli O157:H7 using different detection methods and molecular determination by multiplex PCR and RAPD.*Journal of veterinary science*.;6(1):7-19.

Lee, N., Kwon, K.Y., Oh, S.K., Chang, H.J., Chun, S.H. and Choi, S.W., 2014, A multiplex PCR assay for simultaneous detection of Escherichia coliO157:H7, Bacillus cereus, Vibrio parahaemolyticus, Salmonella spp., Listeria monocytogenes, and Staphylococcus aureus in Korean ready-to-eat food, *Foodborne* Pathogens and Disease, 11(7), 27, 2014

Liu, B., Zhou, X., Zhang, L., Liu, W., Dan, X., Shi, C., et al., 2012, Development of a novel multiplex PCR assay for the identification of Salmonella enterica typhimurium and Enteritidis... *Food Control*, 27, 87-93.

Maurer, F., Tierney. And Robert L. 1999. An AU-rich sequence in the 3′-UTR of plasminogen activator inhibitor type 2 (PAI-2) mRNA promotesPAI-2 mRNA decay and provides a binding site for nuclear HuR. *Nucleic Acids Research*, 1999, Vol. 27, No. 7

Mukhopadhyay, A., Utpal, K. and Mukhopadhyay, N., 2008, Multiplex PCR approaches for the simultaneous detection of human pathogens: Escherichia coli0157:H7 and Listeria monocytogenes. *Journal of Microbiological Methods*, 68, 193-200.

Mutsumi, A., Xin, L., Takaaki, S.h., Takashi, U., Kazuaki, M., Yumi, H., Masatake, A., 2014. Vegetable Surface Sterilization System Using UVA Light-Emitting Diodes.*The Journal of Medical Investigation* Vol. 61, 285-290

Park, Y.S., Lee, S.R., and Kim, Y.G., 2006, Detection of Escherichia coli O157:H7, Salmonella spp., Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes in Kimchi by multiplex polymerase chain reaction (mPCR). *The Journal of Microbiology*, 44(1): 92-97.

Rahn, K., S. A. De Grandis, R. C. Clarke, S. A. McEwen, J. E. Galán, C. Ginocchio, R.Curtiss, III, and C. L. Gyles. 1992. Amplification of an invAgene sequence of Salmonellatyphimuriumby polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella, *Mo*lecular Cell Probes, 6, 271-279.

Rawool DB., Malik S.V.S., Shakuntala I., Sahare A.M. and Barbuddhe S.B., 2007, Detection of multiple virulence associated genes in Listeria monocytogenes isolated from bovine mastitis cases. *Journal of Food Microbiology*, 113, 201–207.

Ryu, J., Park, S.H., Yeom, Y.S., Shrivastav, A., Lee, S.H., Kim, Y.R., et al., 2013, Simultaneous detection of Listeria species isolated from meat processed foods using multiplex PCR, *Food Control*, 32(2), 659–664.

Thapa, S.P., Han,R., Cho, J.M. and Hur, J.H., 2013, Multiplex PCR and DNA array for the detection of Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Escherichia coliO157:H7, and Salmonella spp. Targeting virulence-related genes. *Annuals of Microbiology*, 63(2): 725-731.

Toze, S., 2006. Reuse of effluentwater-benefits and risks. Agriculture *WaterManagement,* 80, 147-159.

Wang, H., Zhang, C.and Xing, D., 2011, Simultaneous detection of Salmonella enterica, Escherichia coli O157:H7and Listeria monocytogenes using oscillatory flow multiplex PCR, *Microchimica* Acta, 173, 503- 512.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 1, Apr. May. 2017, p. 105- 116

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۳، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۳۹۶ ص.۱۱۶-۱۰۵

Simultaneous detection of foodborn pathogenes *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. By Multiplex PCR in ready–to–eat vegetables

S. Rajabzadeh[1], M. Bahreini [1, 2], M. R. Sharifmoghadam[1]

Received: 2015.06.21
Accepted: 2016.02.13

Introduction: Foodborne pathogens are a major public health problem. Despite the increase in management and consumer interest in food safety, the number of food poisoning cases has been continuously increased in recent years. For example in 2010, human salmonellosis cases were reported in Europe and in 2011, a multistate foodborne *E.coli* O157:H7 outbreak affected 8 people and also a larger multistate *Listeria monocytogenes* outbreak caused 146 infections and 29 deaths. Traditional culture methods for detection of microorganisms in food are laborious and time consuming. Due to Economic impact of foodborne contamination and diseases, there are great efforts to develop more sensitive methods for rapid and accurate pathogen detection and identification in foodstuffs. Recently, molecular techniques such as PCR based DNA amplification have been employed that offer several advantages over the classical microbiological methods, such as shortening time of analysis, lowering detection limits, increasing specificity and having potential for automation. In this study we used multiplex PCR system, for the simultaneous detection of the three pathogens (*salmonella* spp., *L. monocytogenes* and *E. coli* O157:H7) in artificially inoculated lettuce.

Materials and methods: Bacterial strains used in this study, Salmonella entrica serovar Typhimurium PTCC1709, Listeria monocytogenes PTCC1298 and E. coli O157:H7 NCTC12900, were grown in Trypticase Soy Broth at 37°C and then serial dilutions of strains from 100 to 106 cfu/ml (1 to 1000000 cfu/ml) were prepared using normal saline (0.85 g/l). Lettuce samples were cut into pieces of 5 ± 0.2 grams. To sterilize, the pieces overwhelm in 3% sodium hypochlorite solution for 15 min and in order to eliminate extra chlorine ions, the samples moved to sterile distilled water containing some drops of 1% sodium thiosulfate for 2 min. Bacterial strains were inoculated on lettuce as pure and mixed cultures separately. For the mixed cultures 100 µl of each bacterial strain inoculated on lettuce (in total 300 µl). The eluted bacteria were re-suspended in 100 µl of sterile normal saline and used for DNA extraction. DNA extraction was performed on each bacterial strain before and after inoculation to lettuce. The target genes were the rfb gene (antigen O157 producer) for E. coli O157:H7, the invA gene (invasion protein A) for salmonella spp., and the prfA gene (transcriptional activator of the virulence factor) for L. monocytogenes. The genes described here have been used as the most specific and reliable genetic targets for the above microorganisms. As an internal control gene, the 16S rRNA gene was targeted in the presence of bacterial DNA.

Monoplex PCR reactions were performed in a final volume of 25 µl. Master mix composition was as follows: PCR buffer 10X, 2.5 µl; MgCl2 25mM, 2.5 µl; Taq DNA Polymerase 5 U/µl, 0.2 µl; dNTPs 10 mM, 0.4 µl; F/R primers 10 pmol, 1µl; extracted DNA as template, 2 µl and distilled water, 15.4 µl. Thermal cycler conditions were as follows: predenaturation at 94°C for 5min; 35 cycles consisting of denaturation at 94°C for 30s, annealing at 55°C for 30s and extension at 72°C for 60s; and final elongation at 72°C for 7 min. Multiplex PCR reactions were performed in a final volume of 25µl using 4 µl of total extracted DNA from three pathogens as template (mixture of three bacteria). Master mix composition was as follows: PCR buffer 10X, 2.5 µl; MgCl2 25 mM, 2.5 µl; Taq DNA Polymerase 5U/µl, 0.5 µl; dNTPs 10mM, 1 µl; EC-F/R, 1 µl; SAL-F/R, 0.8 µl and LIS-F/R, 1 µl (concentration of each primer was 10 pmol) and distilled water 8.9 µl. Thermal cycler conditions were as follows: pre-denaturation at 94°C for 3 min; 35 cycles consisting of denaturation at 94°C for 30s, annealing at 57°C for 30s and extension at 72°C for 90s; and final elongation at 72°C for 10 min. PCR products were visualized via gel electrophoresis, with 1% agarose gels.

2 and 2 – Msc student and Assistant professor, Department of Biology, faculty of sciences, Ferdowsi university of Mashhad, Mashhad, Iran.
(*Corresponding author: safieh.rajabzadeh@gmail.com)

Results and Discussion: The main focus of this work was on the use of rapid method instead of culturing stages for detection of foodborne pathogens from ready-to-eat vegetables. Lettuce was used as a model for ready-to-eat vegetables and inoculated with *E. coli* O157:H7*, salmonella* spp. and *L. monocytogenes*.

Multiplex PCR was performed after elution of bacteria from lettuce and the test provided a detection limit of 1 cfu/1g for three foodborne pathogenic bacteria

The primer selection and multiplex PCR optimization allowed the setting of a robust method with performances comparable to a duplex PCR system, when tested on a complex food system. The sensitivity and robustness of the method proposed, together with its ability to perform well on a complex food matrix, make it a suitable method to be implemented in control laboratories for the detection of the target pathogens in food samples.

Key words: Multiplex PCR, Foodborne Pathogens, Ready-To-Eat Vegetables, Rapid Detection